HIV BLOT 2.2

TEST PAR WESTERN BLOT

CE
0123

DATE DE RÉVISION : 03/07
MAE 0011-FRA-1

Remarque: modifications en surbrillance.

REF (Kit pour 18 tests) : 11030-018
(Kit pour 36 tests) : 11030-036

NOM ET APPLICATIONS

Le test **HIV BLOT 2.2 de MP Diagnostics (MPD)** est un test immunoenzymatique qualitatif de détection *in vitro* des anticorps du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) et de type 2 (VIH-2) dans le sérum ou le plasma humain. Il est destiné à être utilisé comme test complémentaire plus spécifique sur les échantillons sériques ou plasmatiques ayant présenté une réaction positive répétée aux tests de dépistage de type essai par immunoadsorption avec enzyme conjugué (ELISA).

INTRODUCTION

De nombreux tests de dépistage sont disponibles pour la détection des anticorps spécifiques des virus VIH-1 et VIH -2, agents étiologiques du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les tests de ce type peuvent être extrêmement sensibles mais sont susceptibles d'être moins spécifiques, ce qui risque de conduire à des interprétations de faux positifs. Des tests supplémentaires, indépendants et hautement spécifiques, sont donc nécessaires pour confirmer la présence d'anticorps anti-VIH-1et/ou anti-VIH-2.

Le test **HIV BLOT 2.2 de MP Diagnostics** est destiné à être utilisé comme test supplémentaire plus spécifique sur les échantillons sériques ou plasmatiques humains ayant présenté une réaction positive répétée au test ELISA. Des antigènes viraux spécifiques du VIH-1 sont séparés et déposés sur des bandelettes par électrophorèse et électrotransblot. Un peptide synthétique spécifique de VIH-2 est disposé sur la même bandelette. Le test permet une caractérisation plus poussée de la réponse sérologique aux protéines virales spécifiques présentes. Chaque bandelette possède également un contrôle interne de dépôt d'échantillon, ce qui permet de réduire au maximum le risque de faux négatif lié à des erreurs de manipulation et vérifier que les échantillons ont été correctement déposés.

DESCRIPTION DES SYMBOLES UTILISÉS

Il s'agit des symboles graphiques utilisés sur les produits et emballages des produits diagnostiques de **MP Diagnostics**. Ce sont les symboles apparaissant le plus fréquemment sur les équipements médicaux et sur leurs emballages. Ils sont décrits plus en détails dans la notice de normalisation "British and European Standard" BS EN 980: 2003.

- Utiliser avant *Synonyme :* Date de péremption
- Code du lot de fabrication *Synonymes :* Numéro de lot, Numéro de lot de fabrication (LOT)
- Limites de température
- Fabricant
- Contenance suffisante pour <n> tests (Σ)
- Ne pas réutiliser
- Équipement médical à usage diagnostique in vitro (IVD)
- Numéro du catalogue (REF)
- Attention ! Voir les instructions d'utilisation
- Représentant agréé dans la Communauté européenne (EC REP)
- Consulter les instructions d'utilisation

PRINCIPES CHIMIQUES & BIOLOGIQUES DU TEST

Les bandelettes de nitrocellulose sont sensibilisées par des protéines antigéniques séparées et fixées à partir du virus VIH-1 inactivé partiellement purifié, puis incorporées à l'aide d'un transfert (blotting) par électrophorèse. Un peptide de synthèse spécifique du VIH-2 est ajouté sur ces mêmes bandelettes. Chaque bandelette de nitrocellulose est incubée avec le sérum ou le plasma dilué et avec les contrôles. Les anticorps spécifiques au VIH-1 et au VIH-2, s'ils sont présents dans les échantillons, se lieront aux protéines VIH-1 et au peptide VIH-2 des bandelettes. Les substances non liées sont ensuite éliminées par lavage des bandelettes. Les anticorps fixés spécifiquement sur les protéines VIH peuvent être visualisés à l'aide d'une série de réactions à une immunoglobuline de chèvre anti-IgG humaine conjuguée à la phosphatase alcaline et à un substrat BCIP/NBT. Cette méthode est suffisamment sensible pour détecter de très faibles quantités d'anticorps spécifiques au VIH dans le sérum ou le plasma.

ÉLÉMENTS DU KIT

	Description du contenu	Quantité fournie
ANTIGEN STRIPS	**BANDELETTES DE NITROCELLULOSE** Comporte un lysat viral de VIH-1, un peptide d'enveloppe spécifique VIH-2 et une bandelette de contrôle de dépôt sérique. Conserver au sec et à l'abri de la lumière. **CONTRÔLE NÉGATIF**	Disponible par 18 ou 36 bandelettes
CONTROL −	Sérum humain normal inactivé et non réactif à l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) et aux anticorps anti-VIH-1/2 et anti-VHC. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
CONTROL +	**CONTRÔLE POSITIF FORT** Sérum humain inactivé à fort titrage en anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 et non réactif à l'AgHBs et à l'anti-VHC. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
CONTROL WEAK	**CONTRÔLE POSITIF FAIBLE** Sérum humain inactivé à faible titrage en anticorps anti-VIH-1 SEULEMENT et non réactif à l'AgHBs et aux anticorps anti-VIH-2 et anti-VHC. Contient de l'azide de sodium et du thiomersal comme conservateurs.	1 flacon (80 µl)
BUF STOCK 10x	**TAMPON CONCENTRÉ DE STOCKAGE (10x)** Tampon Tris contenant du sérum normal de chèvre inactivé par chauffage. Contient du thiomersal comme conservateur.	1 bouteille (20 ml)
BUF WASH 20x	**TAMPON CONCENTRÉ DE LAVAGE (20x)** Tampon Tris contenant du Tween 20. Contient du thiomersal comme conservateur.	1 bouteille (70 ml)
CONJUGATE	**CONJUGUÉ** Anti-IgG humain de chèvre conjuguée à de la phosphatase alcaline. Contient de l'azide de sodium comme conservateur.	1 flacon (120 µl)
SUBS BCIP / NBT	**SUBSTRAT** Solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) et de nitrobleu de tétrazolium (NBT).	1 bouteille (100 ml)
POWDER BLOTTING	**POUDRE DE BLOTTING** Lait écrémé déshydraté	10 sachets (1 g chacun)
	Plaques d'incubation de 9 puits chacune	2 ou 4 plaques
	Mode d'emploi	1 exemplaire
	Pinces	1 paire

Remarque: Le volume de réactifs fourni permet de réaliser 4 cycles.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

1. Utilisation réservée au diagnostic *in vitro.*
2. Utilisation réservée aux professionnels.
3. Consulter l'emballage du produit pour connaître les composants susceptibles de présenter un risque biologique.

INFORMATIONS RELATIVES À LA SÉCURITÉ ET LA SANTÉ

ATTENTION : Cette trousse contient des substances d'origine humaine. Aucune technique de test ne permet de garantir totalement que les produits sanguins humains ne sont pas susceptibles de transmettre une infection.

MANIPULER LES PRÉLÈVEMENTS À TESTER ET LES CONTRÔLES POSITIFS, FORT ET FAIBLE, ET NÉGATIFS COMME S'IL S'AGISSAIT D'AGENTS POTENTIELLEMENT INFECTIEUX. Il est recommandé de manipuler les composants et les spécimens à analyser conformément aux Bonnes pratiques de laboratoire. Ils doivent également être éliminés dans le respect des règles de sécurité en vigueur.

Le ***Contrôle positif fort, le Contrôle positif faible*** et ***le Contrôle négatif*** contiennent du thiomersal et de l'azide de sodium ; le tampon concentré de stockage et le tampon concentré de lavage contiennent du thiomersal et le conjugué contient de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir au contact du cuivre et du plomb présents dans certaines tuyauteries et former des sels explosifs. Les quantités utilisées dans cette trousse sont limitées. Toutefois, lors de leur élimination, les substances contenant des azides doivent être rincées abondamment afin d'éviter la formation d'azides métallisés dans les tuyauteries.. Ci-après figurent les énoncés des dangers (R) correspondants.

R22 Nocif par ingestion.

Le ***substrat*** contient du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et du nitrobleu de tétrazolium, lequel est classé comme nocif (Xn) par les directives applicables de la Communauté européenne (CEECi-après figurent les énoncés des dangers (R) correspondants.

R20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

1. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons ou bouteilles et de l'extraction d'échantillons de produit.
2. Ne pas pipeter à la bouche.
3. Manipuler les échantillons à tester, les bandelettes de nitrocellulose et les contrôles positif, positif faible et négatif comme des agents potentiellement infectieux.
4. Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables pendant le déroulement du test. Jeter les gants dans des sacs poubelle destinés aux matériaux présentant un risque biologique. Se laver abondamment les mains par la suite.
5. Il est fortement recommandé de procéder à ce test dans un local prévu pour les opérations à risque biologique.
6. Ne pas placer d'aliments et de boissons à proximité des produits.
7. En cas d'accident ou de contact avec les yeux, rincer immédiatement sous une grande quantité d'eau et consulter un médecin.
8. Consulter immédiatement un médecin en cas d'ingestion de substances contaminées ou de mise en contact avec des plaies ouvertes ou autres lésions cutanées.
9. Essuyer immédiatement les éclaboussures de substances potentiellement infectieuses à l'aide de papier absorbant et nettoyer la zone contaminée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1 % avant de reprendre le travail. L'hypochlorite de sodium ne peut être utilisé sur les éclaboussures contenant de l'acide que si la zone a préalablement été essuyée et séchée à l'aide de papier absorbant. Le matériel utilisé (y compris les gants jetables) doit être éliminé comme les matériaux susceptibles de présenter un risque biologique. Ne pas autoclaver les matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.
10. Autoclaver tous les matériaux utilisés et contaminés à 121°C (15 p.s.i.) pendant 30 minutes avant de les évacuer. Il est également possible de décontaminer les matériaux dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 30 à 60 minutes avant de les éliminer dans des sacs poubelle pour produits à risque biologique.
11. Décontaminer tous les produits chimiques et réactifs utilisés en y ajoutant le volume d'hypochlorite de sodium nécessaire pour arriver à une concentration finale d'au moins 1 %. Laisser en contact pendant 30 minutes pour garantir le succès de la décontamination.
12. Il est déconseillé de réutiliser les plaques d'incubation.

PRÉCAUTIONS ANALYTIQUES

1. Le fonctionnement optimal du test n'est possible que dans le **RESPECT ABSOLU** du mode opératoire décrit dans ce mode d'emploi. Le non-respect de ce mode opératoire peut entraîner l'obtention de résultats aberrants.
2. **NE PAS MODIFIER OU ÉCHANGER DES RÉACTIFS DE TROUSSES DIFFÉRENTES.** L'assemblage des contrôles, conjugué et bandelettes de Western Blot est étudié pour un fonctionnement optimal. Utiliser uniquement les réactifs fournis avec la trousse.
3. Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption figurant sur l'emballage de la trousse.
4. Éviter toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons ou bouteilles et de prélèvements de produit. Une contamination réduirait la durée de conservation des trousses et entraînerait l'obtention de résultats erronés. Utiliser des procédés aseptiques, notamment les pipettes ou les embouts jetables de pipette, lors de prélèvements dans les flacons.
5. Les contrôles de la trousse doivent être testés en même temps que les échantillons des patients à chaque cycle de test.
6. Afin d'éviter toute contamination croisée, utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque nouvel d'échantillon.
7. Pour obtenir des résultats optimaux, verser les réactifs encore froids et les replacer le plus rapidement possible entre 2°C et 8°C pour conservation.
8. Il est recommandé de nettoyer la verrerie devant être utilisée avec les réactifs à l'aide d'acide chlorhydrique à 2 M et de la rincer abondamment à l'eau distillée ou désionisée avant utilisation.
9. Utiliser exclusivement de l'eau désionisée ou distillée de qualité réactif pour diluer les réactifs.
10. Tous les réactifs doivent être convenablement mélangés avant utilisation.
11. La solution de conjugué de travail, le tampon de lavage dilué et le tampon de blotting doivent être **préparés juste avant utilisation.**
12. La solution de conjugué de travail doit être préparée à l'aide d'un bécher ou d'un récipient en polypropylène.
13. Ne pas manipuler les réactifs dans une zone contenant un niveau élevé de vapeurs désinfectantes chimiques (par exemple, les vapeurs d'hypochlorite) au cours de leur conservation ou de l'incubation, et ne pas effectuer le test dans une telle zone. La mise contact inhibe la réaction de coloration. Ne pas exposer non plus les réactifs à une forte luminosité.
14. Il est préférable d'effectuer le test à température ambiante (25°C ± 3°C).
15. Veiller à ce que les bandelettes de test soient disposées de façon à ce que les numéros inscrits sur les bandelettes soient dirigés vers le haut.
16. Pour le test de Western Blot, il est important d'utiliser un agitateur à bascule et non un agitateur rotatif. Dans le cas contraire, le fonctionnement de la trousse serait compromis. La vitesse et l'angle d'inclinaison recommandés pour l'agitateur sont respectivement de 12 à 16 cycles par minute et de 5 à 10 degrés.
17. Avant utilisation, vérifier que les équipements automatisés, s'ils sont utilisés, sont validés.
18. Veiller à ce que l'ajout des échantillons se fasse à distance des bandelettes. La plaque peut être inclinée et l'échantillon être ajouté à l'emplacement de collecte du tampon, à l'extrémité inférieure. Ceci permet d'éviter la formation de points sombres liée au dépôt de l'échantillon sur la bandelette.
19. Éviter de conserver les réactifs et les échantillons dans un congélateur auto-dégivrant.
20. Nous déconseillons l'utilisation d'échantillons dilués ou lyophilisés, car ils peuvent fausser les résultats. S'ils forment tout ou partie d'un panel de contrôle qualité (QC), ils doivent être validés.

INSTRUCTIONS DE CONSERVATION

1. Conserver la kit HIV BLOT 2.2 de MPD et ses composants entre 2 et 8°C en dehors des périodes d'utilisation.
2. Lorsqu'ils sont conservés entre 2°C et 8°C, tous les réactifs et toutes les bandelettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur la trousse. Ne pas congeler les réactifs.

A. **Bandelettes à antigènes**
   - Éviter toute exposition inutile des bandelettes d'antigènes à la lumière.

B. **Réactifs**
   - Les réactifs doivent être conservés dans les flacons ou bouteilles d'origine, dont le bouchon doit être en place.
   - Verser tous les réactifs encore froids et les replacer entre 2°C et 8°C pour conservation dès que possible.
   - Un précipité peut se former lorsque le substrat est conservé entre 2°C et 8°C. Ceci n'a aucune incidence sur le fonctionnement de la trousse.

Attention: Éviter toute exposition inutile du substrat à la lumière.

COLLECTE, TRANSPORT ET CONSERVATION DES PRÉLÈVEMENTS

Les échantillons sériques ou plasmatiques recueillis dans l'EDTA, l'héparine ou le citrate de sodium peuvent être utilisés. Avant de les stocker, vérifier que les caillots sanguins ou les cellules sanguines ont été séparés par centrifugation.

Les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C si le test est pratiqué dans les 7 jours suivant le prélèvement et congelés à -20°C ou température inférieure si le test est pratiqué après plus de 7 jours. Il est préférable d'utiliser des prélèvements clairs, non hémolysés. Les échantillons lipémiques, ictériques ou contaminés (par des particules) doivent être filtrés (0,45 µm) ou centrifugés avant le test.

Les prélèvements des patients peuvent être inactivés mais ceci n'est pas indispensable au fonctionnement optimal du test.

Pour les inactiver, procéder comme suit :
1. Retirer le couvercle du récipient contenant les prélèvements.
2. Chauffer le prélèvement à 56 °C pendant 30 minutes au bain-marie.
3. Laisser refroidir le prélèvement avant de refermer le couvercle.
4. Le prélèvement peut être congelé pour être conservé jusqu'à l'analyse.

Il est déconseillé de soumettre le prélèvement des patients à des cycles répétés de congélation-décongélation avant l'analyse.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE NÉCESSAIRE NON FOURNI AVEC LA TROUSSE

- Eau déionisée ou distillée
- Gants jetables
- Un plateau à bascule (offrant une vitesse de basculement allant de 12 à 16 oscillations par minute et un angle d'inclinaison de 5 à 10 degrés afin de permettre un lavage homogène des membranes)
- Pipetteurs et embouts de contenance appropriée
- Aspirateur avec collecteur à l'hypochlorite de sodium
- Bain-marie à 56°C (facultatif)
- Hypochlorite de sodium pour la décontamination

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. **TAMPON DE LAVAGE DILUÉ**
   (a) Le TAMPON DE LAVAGE DILUÉ doit être **préparé juste avant utilisation.**
   (b) Diluer 1 volume de TAMPON DE LAVAGE CONCENTRÉ (20X) dans 19 volumes d'eau de qualité réactif. Bien mélanger.

2. **TAMPON DE BLOTTING**
   (a) Le TAMPON DE BLOTTING doit être **préparé juste avant utilisation.**
   (b) Diluer 1 volume de TAMPON CONCENTRÉ DE STOCKAGE (10X) dans 9 volumes d'eau de qualité réactif. Bien mélanger.
   (c) Ajouter 1 g de POUDRE DE BLOTTING pour chaque volume de 20 ml de TAMPON DE STOCKAGE dilué préparé à l'étape 2(b) ci-dessus. Mélanger afin de garantir la dissolution totale de la poudre.
   (d) Mélanger à nouveau avant de verser.

3. **SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL**
   Remarque : Préparer la solution dans un bécher / récipient en polypropylène.
   (a) La SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL doit être **préparée juste avant utilisation.**
   (b) Préparer la SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL en diluant le CONJUGUÉ à 1/1000 dans le TAMPON DE BLOTTING (par exemple, 5 µl de CONJUGUÉ dans 5 ml de TAMPON DE BLOTTING.

4. **SOLUTION DE SUBSTRAT (prête à l'emploi)**
   (a) Verser directement le volume nécessaire depuis la bouteille. Utiliser une pipette propre. Reboucher fermement après utilisation.

MODE OPÉRATOIRE (TEST RAPIDE)

Remarque: a) Les utilisateurs peuvent employer l'analyse rapide ou durant la nuit pour exécuter les essais. Les bandes d'HIV sont plus développées et plus de bandes peuvent apparaître avec l'analyse durant la nuit, mais l'exécution globale des deux analyses est identique.

b) Aspirer tous les produits chimiques et réactifs utilisés dans un collecteur contenant de l'hypochlorite de sodium.

c) Toutes les incubations doivent être effectuées sur un plateau à bascule.

Attention :
Certains échantillons entraînent l'apparition de marques sombres à l'emplacement de la bandelette où ils sont déposés. Pour éviter ce problème, veiller à procéder comme suit :

i. L'échantillon ne doit être déposé qu'une fois le TAMPON DE BLOTTING ajouté.
ii. Incliner légèrement la plaque en en soulevant l'extrémité supérieure ou inférieure. Le tampon de blotting s'écoule alors jusqu'à l'extrémité inférieure de la plaque. Déposer l'échantillon à l'emplacement où le tampon de blotting est recueilli. Une fois tous les échantillons déposés, remettre la plaque à plat. Veiller à ce que les bandelettes restent humides en permanence au cours de l'opération.
iii. Si l'utilisateur ne souhaite pas incliner la plaque, il lui est également possible de déposer les échantillons à l'extrémité supérieure ou inférieure du puits. Ainsi, l'apparition éventuelle de marques sombres n'empêcherait pas la lecture des résultats sur la bandelette.

Marche à suivre :

1.	Ajouter 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUÉ dans chaque puits.	**2 ml**
2.	À l'aide de pinces, extraire avec précaution le nombre nécessaire de BANDELETTES du tube et les disposer, face numérotée vers le haut, dans chaque puits. Placer des bandelettes pour les contrôles positif fort, positif faible et négatif.	
3.	Incuber les bandelettes pendant 1 à 2 minutes à température ambiante (25 ± 3°C) sur un plateau à bascule (vitesse de 12 à 16 cycles par minute). Éliminer le tampon par aspiration. (Note: Ne laissez pas les bandes sécher l'échec peut avoir comme conséquence les marques aqueuses sur les bandes développées pour quelques spécimens.)	**2 minutes**
4.	Ajouter 2 ml de TAMPON DE BLOTTING dans chaque puits.	**2 ml**
5.	Ajouter 20 µl de sérum du patient ou autant de contrôle dans les puits appropriés. Veiller à ne pas déposer les prélèvements directement sur les bandelettes.	**20 µl**
6.	Recouvrir la plaque avec le couvre-plaque fourni et incuber pendant 1 heure à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule.	**60 minutes**
7.	Retirer le couvre-plaque avec précaution de façon à éviter d'éclabousser ou de mélanger les échantillons. Incliner la plaque pour aspirer le mélange dans les puits. Changer l'embout de l'aspirateur à chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée.	
8.	Laver chaque bandelette à 3 reprises avec 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUÉ en laissant tremper pendant 5 minutes sur le plateau à bascule entre chaque lavage.	**3 x 2 ml**
9.	Ajouter 2 ml de SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL dans chaque puits.	**2 ml**
10.	Couvrir la plaque et incuber pendant 1 heure à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule.	**60 minutes**
11.	Aspirer le CONJUGUÉ dans les puits. Laver comme indiqué à l'étape 8.	**3 x 2 ml**
12.	Ajouter 2 ml de SOLUTION DE SUBSTRAT dans chaque puits.	**2 ml**
13.	Couvrir la plaque et incuber pendant 15 minutes sur le plateau à bascule. (Note: La réaction peut être arrêtée avant 15 minutes si toutes les bandes sont évidentes.)	**15 minutes**
14.	Aspirer le SUBSTRAT et rincer les bandelettes à au moins trois reprises à l'aide d'eau de qualité réactif afin d'arrêter la réaction. (Une coloration de fond sombre peut apparaître si le lavage est insuffisant à cette étape.)	**3 x 2 ml**
15.	À l'aide de pinces, placer délicatement les bandelettes sur du papier absorbant. Couvrir avec le papier absorbant et sécher. Il est également possible de laisser les bandelettes sécher dans les puits de la plaque.	
16.	Fixer les bandelettes sur une feuille de résultats (papier blanc non absorbant). Ne pas appliquer de ruban adhésif au niveau des bandelettes révélées. Examiner les bandelettes (voir l'interprétation des résultats) et reporter les résultats. Pour les stocker, maintenir les bandelettes dans l'obscurité.	

MODE OPÉRATOIRE ALTERNATIF (TEST SUR 2 JOURS)

Marche à suivre :

1.	Ajouter 2 ml de TAMPON DE LAVAGE DILUÉ dans chaque puits.	**2 ml**
2.	À l'aide de pinces, extraire avec précaution le nombre nécessaire de BANDELETTES du tube et les disposer, face numérotée vers le haut, dans chaque puits. Placer des bandelettes pour les contrôles positif fort, positif faible et négatif.	
3.	Incuber les bandelettes pendant 1 à 2 minutes à température ambiante (25 ± 3°C) sur un plateau à bascule (vitesse de 12 à 16 cycles par minute).Éliminer le tampon par aspiration. (Note: Ne laissez pas les bandes sécher l'échec peut avoir comme conséquence les marques aqueuses sur les bandes développées pour quelques spécimens.)	**2 minutes**
4.	Ajouter 2 ml de TAMPON DE BLOTTING dans chaque puits.	**2 ml**
5.	Ajouter 20 µl de sérum du patient, ou autant de contrôle, dans les puits appropriés.	**20 µl**
6.	Recouvrir la plaque avec le couvre-plaque fourni et incuber jusqu'au lendemain (16 - 20 heures) à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule.	**toute la nuit**
7.	Retirer le couvre-plaque avec précaution de façon à éviter d'éclabousser ou de mélanger les échantillons. Incliner la plaque pour aspirer le mélange des puits. Changer l'embout de l'aspirateur à chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée.	
8.	Laver chaque bandelette à 3 reprises avec 2ml TAMPON DE LAVAGE DILUÉ en laissant tremper pendant 5 minutes sur le plateau à bascule entre chaque lavage.	**3 x 2 ml**
9.	Ajouter 2 ml de SOLUTION DE CONJUGUÉ DE TRAVAIL dans chaque puits.	**2 ml**
10.	Couvrir la plaque et incuber pendant 30 minutes à température ambiante (25 ± 3°C) sur le plateau à bascule.	**30 minutes**
11.	Aspirer le CONJUGUÉ dans les puits. Laver comme indiqué à l'étape 8.	**3 x 2 ml**
12.	Ajouter 2 ml de SOLUTION DE SUBSTRAT dans chaque puits.	**2 ml**
13.	Couvrir la plaque et incuber pendant 15 minutes sur le plateau à bascule. (Note: La réaction peut être arrêtée avant 15 minutes si toutes les bandes sont évidentes.)	**15 minutes**
14.	Aspirer le SUBSTRAT et rincer les bandelettes à au moins trois reprises à l'aide d'eau de qualité réactif afin d'arrêter la réaction. (Une coloration de fond sombre peut apparaître si le lavage est insuffisant à cette étape.)	**3 x 2 ml**
15.	À l'aide de pinces, placer délicatement les bandelettes sur du papier absorbant. Couvrir avec le papier absorbant et sécher. Il est également possible de laisser les bandelettes sécher dans les puits de la plaque.	
16.	Fixer les bandelettes sur une feuille de résultats (papier blanc non absorbant). Ne pas appliquer de ruban adhésif au niveau des bandelettes révélées. Examiner les bandelettes (voir l'interprétation des résultats) et reporter les résultats. Pour les stocker, maintenir les bandelettes dans l'obscurité.	

RÉSUMÉ DES PROTOCOLES DE TEST

Réactifs	Qté	Temp. ambiante Test rapide	Temp. ambiante Test sur 2 jours
Bandelette de nitrocellulose	1	-	-
Tampon de lavage	2 ml	1-2 min	1-2 min
Tampon de blotting	2 ml	-	-
Prélèvement	20 µl	60 min	D'un jour sur l'autre (16 - 20 heures)
Tampon de lavage	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Conjugué	2 ml	60 min	30 min
Tampon de lavage	3 x 2 ml	3 x 5 min	3 x 5 min
Substrat (prêt à l'emploi)	2 ml	15 min (ou moins)	15 min (ou moins)
Eau distillée	3 x 2 ml	-	-

QUANTITÉ DE RÉACTIF NÉCESSAIRE SELON LE NOMBRE DE BANDELETTES

Réactifs	NOMBRE DE BANDELETTES UTILISÉES						
	3	6	9	15	20	27	36
Tampon de lavage 1X (ml)	60	100	140	240	300	400	520
Tampon de blotting 1X (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Conjugué (µl)	11	17	23	35	45	59	77
Substrat (ml)	11	17	23	35	45	59	77
Poudre de blotting (g)	1	2	3	4	5	6	8

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé de recourir aux contrôles négatif, positif fort et positif faible à chaque test quel que soit le nombre d'échantillons testés. Pour que les résultats obtenus à l'issu d'un test soient valables, les conditions suivantes doivent être remplies :

1. **CONTROLE NÉGATIF**
   Aucune bande spécifique au VIH-1 ou au VIH-2 ne doit apparaître sur les bandelettes de contrôle négatif. La bande correspondant au contrôle du dépôt sérique doit être visible (voir fig. 1c).

2. **CONTROLE POSITIF FORT**
   Toutes les bandes des poids moléculaires pertinents doivent apparaître. La figure 1a décrit l'emplacement relatif des bandes visualisées avec le test HIV BLOT 2.2 de MPD et permet d'identifier les bandes observées pour le CONTRÔLE POSITIF FORT. Les différentes bandes sont les p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120/gp160. D'autres bandes associées aux antigènes nucléocapsidiques (p39, p42) peuvent également être visibles. Veiller à ne pas les interpréter à tort comme des gp41. Les antigènes d'enveloppe, gp41, gp120/gp160, apparaissent comme des bandes diffuses, typiques des glycoprotéines. La bande de contrôle sérique est visible. La bande spécifique au VIH-2 doit également être visible comme indiqué dans la figure 1a.

3. **CONTRÔLE POSITIF FAIBLE**
   Le contrôle positif faible permet de mesurer la sensibilité de la trousse. Des bandes peu marquées doivent apparaître en p24 et/ou gp41 et gp120/gp160. D'autres bandes peu marquées peuvent être ou non présentes. La bande de contrôle sérique est visible (voir fig. 1b).

INTERPRETATION DES RÉSULTATS

REMARQUE : Les bandelettes révélées doivent être totalement sèches afin d'éviter toute erreur d'interprétation.

La présence ou l'absence d'anticorps anti-VIH-1 dans un échantillon est déterminée en comparant chaque bandelette de nitrocellulose aux bandelettes de contrôles négatifs et positifs faible et fort.

La figure 1a est donnée en exemple pour faciliter l'identification des diverses bandes apparaissant sur les bandelettes soumises au contrôle POSITIF FORT.

REMARQUE IMPORTANTE : L'extrémité numérotée des bandelettes doit être dirigée vers le bas comme indiqué sur la figure, c'est-à-dire que les bandes gp120/gp160 doivent être en position distale par rapport à l'extrémité numérotée.

POIDS MOLÉCULAIRE	GÈNE	ANTIGÈNE	DESCRIPTION
gp 160	ENV	Forme polymérique de gp41	Glycoprotéine Bande large, diffuse
gp 120	ENV	Extra membranaire	Glycoprotéine Bande diffuse
p66	POL	Transcriptase inverse	Bande étroite
p55	GAG	Protéine précurseur	Bande étroite
p51	POL	Transcriptase inverse	Bande étroite juste en dessous de p55
p39	GAG	Fragment de p55	Bande étroite
gp41	ENV	Transmembranaire	Glycoprotéine diffuse
p31	POL	Endonucléase	Double bande
p24	GAG	Protéine nucléocapsidique	Bande large
p17	GAG	Protéine nucléocapsidique	Bande large

Certains antigènes présents dans ce tableau sont dérivés du même précurseur et peuvent avoir des épitopes en commun. Ceci doit être pris en compte lors de l'interprétation du schéma, par exemple

1. Il est improbable de détecter gp41 en l'absence de gp160 car gp160 est la forme polymérique de gp41 et la concentration en gp160 est plus élevée que celle en gp41 dans le test HIV BLOT 2.2 de MPD. Le gp41 apparaît sous la forme d'une bande diffuse. Une bande nette et étroite au niveau de la région du gp41 ne doit pas être interprétée comme étant une bande gp41. De nombreux prélèvements normaux et non infectés par le VIH présentent une réaction positive à cet antigène non-VIH, ce qui a probablement pour origine la lignée cellulaire humaine utilisée pour la croissance du virus VIH.

2. La bande p55 est généralement détectée en présence d'une forte réactivité au p24 et/ou au p17. Les bandes apparaissant comme p42 et p39 correspondent toutes deux à des fragments de GAG et ne doivent pas être interprétées comme gp41 (ENV).

3. Les bandes POL p66, p51 et p31 sont généralement détectées simultanément. La sensibilité des p66 et p31 est toutefois plus importante que celle de la p51.

4. La réactivité croisée du VIH-2 est variable mais présente généralement une réactivité aux antigènes GAG et/ou POL. Une réactivité croisée avec la bande gp160 est toutefois possible dans certains cas, mais rarement avec la gp41.

5. Il existe également une bande de poids moléculaire élevé d'environ 160 KD qui est supposée correspondre à une protéine précurseur GAG-POL. Ceci est observé avec certains sérums à fort titrage en anti-VIH-2 ou indéterminés (réactivité GAG seulement) mais la bande apparaît alors nette et étroite, contrairement à la bande diffuse correspondant à la gp160 ENV.

Le processus d'interprétation se déroule comme suit :-

1. S'assurer que la bande de contrôle est visible. En l'absence de cette bande de contrôle, les résultats doivent être considérés comme invalides du fait d' une erreur technique telle que l'oubli de l'échantillon, du conjugué ou du substrat.
2. Identifier le poids moléculaire de chaque bande visible sur la bandelette en utilisant comme référence les contrôles POSTIFS FORT et/ou FAIBLE.
3. L'interprétation de la bandelette est ensuite basée sur la présence de bandes spécifiques selon les recommandations des autorités compétentes (à savoir le ministère de la santé, l'Organisation Mondiale de la Santé, etc.).

Les recommandations applicables pour l'interprétation peuvent varier en fonction des politiques locales. MPD recommande de suivre la législation en vigueur dans le pays où le test est utilisé. Certains des critères recommandés par différentes organisations internationales sont répertoriés ci-dessous:

ORGANISATION	CRITÈRES D'INTERPRÉTATION POSITIVE DES TESTS WESTERN BLOT
Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors / Centers for Disease Control (ASTPHLD1/CDC), 1989 USA	Au moins 2 bandes parmi P24, gp41 gp120/160
Centre National de Transfusion Sanguine	Deux bandes ENV(2) avec GAG ou POL
Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 1990	Deux bandes ENV avec ou sans GAG ou POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization -CRSS (Consortium pour la standardisation des tests sérologiques sur rétrovirus) 1988 USA	Une bande ENV avec p24 ou p31
American Red Cross (Croix rouge américaine) 1988 USA	GAG, POL et ENV, une bande de chaque
Chinese Center for Disease Control and Prevention (CCDCP) 2004 Chine	Deux bandes ENV ou une bande ENV avec P24
National and State Reference Laboratories (NRL) 1987 Australie	Une bande ENV avec au moins une des bandes GAG ou POL
Société allemande de lutte contre les maladies virales (DVV)	Une bande ENV avec au moins une bande GAG ou POL, voir aussi DIN 58 969, section 41.

[1]ASTPHLD a été rebaptisé Association of Public Health Laboratories en 1998

Pour l'interprétation du test HIV BLOT 2.2 de MPD, nous recommandons les critères définis ci-dessous. Les résultats doivent être enregistrés pour chaque bande détectée et être interprétés comme étant NÉGATIFS, POSITIFS ou INDÉTERMINÉS.

PROFIL DE L'ÉCHANTILLON	INTERPRÉTATION
Aucune bande virale spécifique n'est présente	NÉGATIF
Détection d'anticorps p17 **UNIQUEMENT**, pas d'autre bande	NÉGATIF
Détection de 2 ENV (gp160/gp41 et gp120) et GAG (p17, p24, p55) **ou** POL (p31, p51, p66)	POSITIF AU VIH-1
Détection de 2 ENV (gp160/gp41 et gp120) et GAG (p17, p24, p55) **ou** POL (p31, p51, p66) et bande spécifique au VIH-2 visible	POSITIF AU VIH-1 avec VIH-2 POSSIBLE
Bandes virales spécifiques présentes mais profil **ne remplissant pas** les critères de POSITIVITÉ	INDÉTERMINÉ[2]
Bandes virales spécifiques présentes, profil **ne remplissant pas** les critères de POSITIVITÉ, mais bande spécifique au VIH-2 visible	INDÉTERMINÉ[2] avec VIH-2 POSSIBLE

[2]INTERPRETATION DES RESULTATS POUR LES TESTS INDETERMINES:

Les résultats INDETERMINES ne doivent pas être utilisés comme base de diagnostic de l'infection HIV1. En se basant sur le fait que la plupart des personnes ayant un résultat initial INDETERMINE et qui sont infectés avec le virus HIV1 vont développer en moins d'un mois des anticorps HIV détectables, le CDC (2001) a recommandé que de telles personnes soient retestées plus ou moins un mois plus tard. Les personnes dont le résultat INDETERMINE persiste après un mois ne sont probablement pas infectées sauf si une exposition récente au virus est suspectée.

D'après une récente étude de FIEBIG *et al* (2003), bien que la fenêtre de détection pour une infection primaire à HIV1 puisse atteindre 22 jours, l'évolution du Blot d' INDETERMINE à franchement POSITIF ne prend pas plus que 8 jours. De plus, ce laboratoire affirme que les Western Blot INDETERMINE sont toujours accompagnés d'ARN HIV1 détectables dans le cas de réelles infections. Inversement, aucune séroconversion ne s'est avérée lors du suivi de personnes ayant été testées positives avec un Western Blot INDETERMINE, une fois confirmées comme négatives par la PCR (Sethoe *et al*, 1995). Donc il est raisonnable de considérer les personnes ayant un résultat Western Blot INDETERMINE avec un test ARN négatif comme probablement non infectés par le VIH, surtout quand les individus testés sont connus comme n'étant pas "à risque".

En particulier, les personnes testées INDETERMINE en Western Blot et ayant été testés avec un ELISA de 4ème génération devraient de plus subir le test ARN utilisant une base moléculaire comme le RT-PCR couvrant les HIV 1/2/O. Si nécessaire, un suivi doit être mené un mois plus tard avec un test supplémentaire. La seule raison d'utiliser la technique ELISA de 4ème génération est la détection simultanée des antigènes et des anticorps. Par conséquent, les échantillons identifiés comme positifs avec une technique ELISA de 4ème génération doivent contenir ou les antigènes ou les anticorps ou les deux. Bien que plus de 95% des cas de vrais positifs identifiés par une technique de 4ème génération soient réellement confirmés par Western Blot (Ly *et al*, 2000), un test supplémentaire utilisant la détection ARN est apparu inévitable pour la petite part de réactivité liée à l'antigène P24. De nouveau, les personnes non considérées comme "à risque" ne sont probablement pas infectées par le HIV, si elles sont détectées positives par l'ELISA de 4ème génération avec un Western Blot INDETERMINE et un résultat ne pouvant être confirmé comme positif par la technique ARN couvrant les HIV 1/2/O.

Néanmoins, les tests ADN et ARN du HIV pour la détection des acides nucléiques (NAT) n'étaient pas reconnus à des fins de diagnostic par les autorités compétentes (US CDC, 2001; Constantine & Zink, 2005) jusqu'il y a peu de temps. A ce jour, un seul test qualitatif ARN est reconnu par la FDA des US pour le diagnostic primaire des infections aigues à HIV. Donc, les algorithmes recommandés par le CDC des US (2001) et de l'OMS (2004) doivent encore être mis à jour et les tests acides nucléiques (NAT) doivent y être inclus comme méthodes permettant de résoudre les résultats INDETERMINE en Western Blot. Cependant, le CDC des US (2001) reconnaissait qu'en présence des spécialistes clinique et de laboratoire, les tests nucléiques (NAT) pouvaient être utiles pour déterminer le statut infectieux des personnes ayant un résultat en Western Blot INDETERMINE.

LIMITES DE LA MÉTHODE

La détection d'anticorps du VIH-1 ne permet pas d'établir un diagnostic du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Un BLOT NÉGATIF n'offre pas la garantie que le virus du SIDA n'est pas présent. Bien qu'un blot POSITIF en anticorps du VIH-1 indique la présence d'une infection par le virus, le diagnostic du SIDA ne peut être établi que sur un tableau clinique selon des critères définis par le Centre de contrôle des maladies (États-Unis), l'Organisation mondiale de la santé ou autre organisme pertinent.

Il est reconnu que des personnes ayant fait une séroconversion récente peuvent présenter des profils incomplets mais elles développent une réactivité accrue (en nombre comme en intensité de bandes) après deux à six mois. La plupart des Blots POSITIFS présenteront d'autres bandes virales spécifiques visibles.

Les Blots INDÉTERMINÉS ne doivent pas être utilisés comme base pour le diagnostic de l'infection par le VIH-1. Pour tous les BLOTS INDÉTERMINÉS, il est recommandé de renouveler le test sur le prélèvement d'origine et sur des échantillons consécutifs. Les donneurs de sang dont les blots sont INDÉTERMINÉS doivent être retestés à partir d'un nouveau prélèvement au bout de deux à six mois. De plus anticorps anti-p24 et anti-p31 augmentent au cours de l'évolution du SIDA, faisant passer l'interprétation du blot de POSITIF à INDÉTERMINÉ. En pareil cas, l'interprétation des résultats doit être fondée sur les tests de blot consécutifs et les évaluations cliniques.

En raison de sa nature hautement spécifique, l'absence de réactivité des échantillons au peptide d'enveloppe spécifique au VIH-2 dans le cadre d'un profil indéterminé ne doit pas exclure la possibilité d'une infection avec d'autres souches de VIH-2.

Les échantillons présentant une infection possible au VIH-2 doivent être analysés plus avant à l'aide d'un test de HIV-2 Western Blot.

CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT SPÉCIFIQUES

Le fonctionnement du test HIV BLOT 2.2 de MPD de détection des anticorps au VIH-1 ou au VIH-2 a été évalué par des essais cliniques.

Tableau 1 : Étude de sensibilité sur la réactivité de l'antigène viral VIH-1 avec des échantillons séropositifs au VIH-1. (Nombre d'échantillons = 197)

PROFILE SÉROLOGIQUE	HIV BLOT 2.2 NOMBRE (%)	DUPONT/ORTHO VIH-1 WB NOMBRE (%)
GAG, POL et ENV	192 (97,5 %)	188 (95,4 %)
p24, p31, gp41 et/ou gp120/gp160	187 (94,9 %)	179 (90,9 %)
ENV et GAG ou POL	197 (100,0 %)	197 (100,0 %)

Tableau 2 : Étude de spécificité sur la réactivité de l'antigène viral VIH-1 avec des échantillons de donneurs normaux et des sérums porteurs d'autres infections virales.

ÉCHANTILLON (TYPE)	NOMBRE	POSITIFS	RÉACTIVITÉ AU VIH-1	
			INDÉTERMINÉS[3]	NÉGATIFS
Donneurs normaux	208	0	11	197
HTLV-1	5	0	0	5
CMV	5	0	1	4
Virus Epstein-Barr (VEB) (IgM)	5	0	1	4
Zona (IgG)	5	0	1	4
Rougeole	6	0	2	4
Rubéole	5	0	1	4
Oreillons	4	0	1	3
Adénovirus	5	0	2	3
HSV	5	0	0	5
Dengue	5	0	1	4
Total	**258**	**0**	**21**	**237**

[3] Tous présentaient une bande p24 ou p17 seulement.

Tableau 3 : Étude de sensibilité de la bande peptide VIH-2 sur des échantillons séropositifs au VIH-2. (Nombre d'échantillons = 178)

VIH-2 Western Blot : Profile sérologique[@]	Réactivité peptide VIH-2	
	Positif	Négatif
GAG, POL et 2 ENV	160	0
GAG, POL et 1 ENV	18	0

[@]Sérums trouvés positifs avec le nouveau test LAV Blot 2 de Pasteur. Résultats fournis par Dr Oliviero E. Varnier et Dr Flavia Lillo. Laboratoire des rétrovirus humains. Université de Gênes.

Tableau 4 : Étude de spécificité de la bande peptide VIH-2 sur des sérums séropositifs au VIH-1, des échantillons de donneurs normaux et des sérums porteurs d'autres infections virales.

TYPE D'ÉCHANTILLON	NOMBRE	RÉACTIVITÉ PEPTIDE VIH-2	
		POSITIFS	NÉGATIFS
Séropositifs au VIH-1	197	16[a]	181
Donneurs normaux	208	0	208
Séropositifs au HTLV-1	5	0	5
CMV	5	0	5
Virus Epstein-Barr (VEB) (IgM)	5	0	5
Zona (IgG)	5	0	5
Rougeole	6	0	6
Rubéole	5	0	5
Oreillons	4	0	4
Adénovirus	5	0	5
HSV	5	0	5
Dengue	5	0	5
Total	**455**	**16**	**439**

[a]Testés avec HIV-2 Western Blot de MPD, 6 de ces échantillons sont apparus réactifs aux ENV et GAG ou POL, 9 de ces échantillons ont eu une réactivité uniquement avec GAG et/ou POL et un échantillon était négatif.

Le test HIV Blot 2.2 de MPD a été pratiqué sur 15 panels commerciaux de séroconversion au VIH-1. Les résultats ont montré que le test était capable de détecter les anticorps au VIH plus précocement ou dans le même échantillon pour tous les panels.

LIMITES DE GARANTIE

Le fabricant ne garantit la trousse de test que pour un usage diagnostique *in vitro* sous réserve que soient respectées les spécifications et limites décrites dans le mode d'emploi du produit et que celui-ci soit utilisé conformément aux présentes instructions. Le fabricant décline toute responsabilité, explicite ou implicite, y compris celle, implicite ou explicite, liée à la qualité marchande, l'aptitude à l'emploi ou le fonctionnement implicite à une fin particulière. Le fabricant ne peut s'engager que sur un remplacement ou un remboursement du produit. Le fabricant ne peut être tenu responsable par l'acheteur ou toute autre partie d'aucune détérioration, blessure ou perte financière résultant de l'utilisation du produit.

PROBLÈMES TECHNIQUES / RÉCLAMATIONS

Dans l'éventualité d'un problème technique / d'une réclamation, procéder comme suit :

1. Noter le numéro de lot de la trousse, la date de péremption et le numéro de lot de la bandelette.
2. Conserver les trousse set les résultats obtenus.
3. Contacter le bureau MP Biomedicals le plus proche ou votre distributeur local.

BIBLIOGRAPHIE

1. V.C.W.Tsang, K. Hancock, M. Wilson. D.F. Palmer, S. Whaley, J.S. Mc Dougal, and S. Kennedy. March 1985. Developmental Procedure : Enzyme-linked Immunoelectro-transfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies; CDC, Altanta.
2. H. Towbin, T. Staehlin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci.. USA 76: 4350-4354.
3. J. Schupbach, M. Popovic, R. V. Gilden. M.A. Gonda, M. G. Sarngadharan and R. C. Gallo. 1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. Science 224, 503-505.
4. M. G. Sarngadharan, M. Popovic, L. Bruch, J. Schupbach and R. C. Gallo. 1984. Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.
5. CDC. 1985. " Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome" - United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34 (1) :1-5.
6. Proposed World Health Organization 1990 criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II, Weekly Epidemiological Record 65(37), 281-283.
7. F. Clavel, D. Guetard., F. Brun-Vezinet, et al. 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346.
8. F. Clavel., 1987. HIV-2, the West African AIDS virus. AIDS 1:135-140.
9. R.S. Tedder, A. Hughes, T. Corrah et al 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930.
10. Bottiger B., A. Karlsson, F. Andreasson et al. 1990. Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J. Virol. 64(7):3492-3499.
11. Centers for Disease Control. 2001. Revised Guidelines for HIV Counseling, Testing, and Referral and Revised Recommendations for HIV Screening of Pregnant Women — United States, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 50: RR-19.
12. Fiebig, E. W., D. J. Wright, B. D. Rawal, P. E. Garrett, R. T. Schumacher, L. Peddada, C. Heldebrant, R. Smith, A. Conrad, S. H. Kleinman, and M. P. Busch. 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS. 17:1871-1879.
13. Ly, T. D., C. Edlinger, and A. Vabret. 2000. Contribution of combined detection assays of p24 antigen and anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. J Clin Microbiol. 38:2459-2461.
14. Sethoe, S. Y., A. E. Ling, E. H. Sng, E. H. Monteiro, R. K. Chan. 1995. PCR as a confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals with indeterminate western blot (immunoblot) profiles. J Clin Microbiol. 33:3034-3036.
15. Constantine, N. T. and H. Zink. 2005. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res. 121:519-538.
16. World Health Organization. 2004. Guidelines for HIV Diagnosis and monitoring of antiretroviral therapy. Regional Office for South-East Asia, New Delhi, India.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
85 Science Park Drive
#04-01, The Cavendish
Singapore Science Park
Singapour 118259
Tél. : + 65 6775 0008
Fax : + 65 6775 4536
Courriel : enquiry_ap@mpbio.com

EC REP
Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert
Allemagne
Tél. : + 49 68 94 58 1020
Fax : + 49 68 94 58 1021
Courriel : info@mt-procons.com

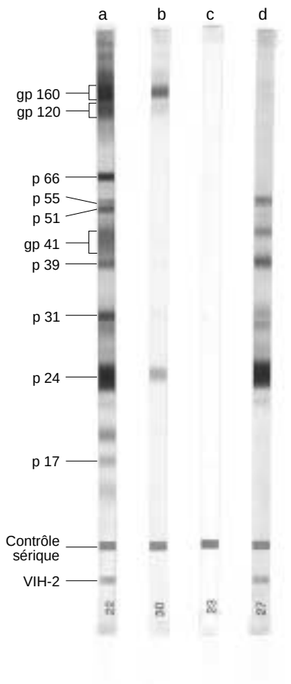
Bureaux régionaux :

MP Biomedicals
Parc d'Innovation, BP 50067
67402 ILLKIRCH CEDEX
France
Tél. : +33 388 67 46 07
Fax : +33 388 67 54 20
Courriel : custserv.eur@mpbio.com

* États-Unis Brevet 5 721 095

* Le nom et le logo Genelabs sont concédés sous licence par Genelabs Technologies, Inc.

FIGURE 1



a. Contrôle positif fort (réactif au VIH-1 et au VIH-2)
b. Contrôle positif faible (réactif uniquement au VIH-1)
c. Contrôle négatif
d. Sérum typique séropositif au VIH-2

TABLEAU DE DÉPANNAGE

Des points sombres se développent sur les bandelettes
1. Contamination bactérienne ou fongique de l'échantillon de test.
2. Précipitation de complexes immuns dans un échantillon de test ancien.
3. Contamination bactérienne ou fongique sur la bandelette en raison d'une conservation inadaptée.
4. Bandelettes physiquement endommagées, craquelées ou rayées.
5. Bandelettes mal lavées entre les étapes du test.

Des marques blanches se développent sur les bandelettes
1. Bandelettes retournées au cours du test.
2. Plaques mal lavées avant utilisation.
3. Faible dissolution de la poudre de blotting.
4. Interférence par électrotransblot au cours de la fabrication.

Les bandes attendues ne se développent pas ou sont de faible intensité

Vérifier le contrôle positif

Contrôle positif faible

Le problème est probablement dû aux réactifs.
1. Réactifs incorrectement préparés.
2. Mauvaise dilution du conjugué.
3. Réactifs instables en raison d'une exposition à une température inappropriée.
4. Conjugué contaminé par de l'IgG humain.
5. pH incorrect du substrat causé par une exposition à une forte lumière à ultraviolet ou un réducteur.
6. Plaques, réactif(s) ou eau contenant une forte concentration de phosphate.
7. Utilisation d'un plateau rotatif au lieu d'un plateau à bascule.

Contrôle positif OK

Le problème est probablement dû à l'échantillon de test.
1. Mauvaise dilution de l'échantillon de test.
2. Échantillon de test contaminé par le conjugué.
3. Échantillons de test contenant une forte concentration de complexes immuns.
4. IgG de l'échantillon de test détérioré ou dénaturé par des cycles répétés de congélation-décontamination ou une conservation inadaptée.
5. Utilisation d'un plateau rotatif au lieu d'un plateau à bascule.
6. Il s'agit d'un échantillon de test ELISA « faux » positif.

Des bandes non spécifiques n'indiquant pas d'infection possible au VIH-2 se développent
1. L'échantillon est trop fort et réagit à des quantités insignifiantes d'intermédiaires.
2. L'échantillon interagit avec les protéines H-9 présentes dans la préparation virale (HLA, ABC, DR, par exemple).
3. Bandes légitimes (antigène d'enveloppe déglycosylé) identifiées à environ 80-90 kD dans certains échantillons de test.

Une forte coloration de fond se développe sur la bandelette en l'absence ou la présence de bandes positives
1. Bandelettes surdéveloppées (arrêter la réaction plus tôt).
2. Lavage incomplet.

Absence de bande de contrôle sérique
1. Sérum non ajouté.
2. Bandelettes retournées au cours du test.
3. Conjugué non ajouté.
4. Substrat non ajouté.

Des bandes autres que la bande de contrôle sérique se développent sur le contrôle négatif

Les cupules de plaque ou le contrôle ont fait l'objet d'une contamination croisée.

Des bandes non spécifiques et/ou une coloration de fond sombre se développent sur les bandelettes
1. Mauvaise dilution de l'échantillon de test ou du conjugué.
2. Incubation de l'échantillon de test/du réactif trop longue.
3. Lavage incomplet au cours du test.
4. Température d'incubation supérieure à 30 °C.
5. Échantillon de test réactif aux protéines non virales.

Les bandelettes sont défectueuses
1. Elles sont craquelées.
2. Elles contiennent des bulles d'air provoquant l'apparition de points blancs dans les zones réactives ; points suffisamment gros pour empêcher toute détection.
3. Elles présentent des points sombres causés par un développement fongique lors de l'ouverture initiale des tubes de bandelettes. Toutefois, si des points sombres se développent après l'ouverture initiale du tube, le problème provient de conditions de conservation inadéquates au site de l'utilisateur.

Bande nette et étroite au niveau de la région du gp41
1. Il ne s'agit pas de la région du gp41 car le gp41 apparaît sous la forme d'une bande diffuse.
2. Ne pas interpréter comme étant gp41.
3. Il s'agit probablement d'une protéine de lignée cellulaire, p42.

Marques aqueuses sur les bandelettes développées
1. Bandelettes laissées à sécher après l'étape de prétrempage, avant l'ajout du tampon de blotting.